

LECTURE SUMMARY SERIES OF  
THE SIXTH ORGANISM CATALYST CHEMISTRY SYMPOSIUM

Date: December 12 (Thursday) and 13 (Friday), 2002

Place: Nara Prefecture Cultural Hall (Noborioji-cho 6,  
Nara city)

Sponsor: Group Biocatalyst Chemistry Japan

Cosponsors:

The Chemical Society of Japan Kinki branch

The society of Synthetic Organic Chemistry, Japan Kansai  
branch

Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and  
Agrochemistry

The Pharmaceutical Society of Japan

The Japanese biochemical Society

The Society for biotechnology, Japan

Caretakers:

Kaoru Nakamura, Rio Yamanaka (Kyoto University, Institute  
for Chemical Research)

Tomoko Matsuda (Ryukoku University, Faculty of Science  
and Technology, Department of Materials Chemistry)

A  $\beta$ -keto ester reduction enzyme derived from *P. citrinum* shows an activity depending on NADPH. The gene of this enzyme (ker) was cloned, and its properties were clarified. Further, for establishing an efficient production system of an optical active alcohol using this enzyme, an asymmetric reduction reaction of methyl 4-bromo-3-oxobutanoate (BAM) was investigated with *E. coli* under co-expression of a co-enzyme reproduction system using glucose dehydrogenase.

For producing an optical active alcohol with this enzyme under co-expression of a co-enzyme reproduction enzyme, a glucose dehydrogenase gene, *gdh* obtained from *Bacillus subtilis* was tandem-connected onto a plasmid pTrcRPc, at the upstream or downstream of the *ker* gene, to cause co-expression of both enzymes. Using the *E. coli* cells, a BAM reduction reaction was conducted. Particularly, by switching the positions of *ker* and *gdh* on the plasmid, the activities of the expressed enzymes were compared. Further, for effecting a reaction using a substrate of high concentration, a combination of medium composition, temperature, glucose addition amount, composition of reaction liquid, pH and water-organic solvent two-phase system was investigated. Furthermore, for improving the stability and optical purity of a wild type enzyme, the protein engineering mode modification of the enzyme was conducted, to obtain a modified enzyme improved

in both stability and optical purity. Now, a reaction using this modified enzyme is being investigated.

# 第6回生体触媒化学シンポジウム

## 講演要旨集

会 期 平成14年12月12日(木)、13日(金)

会 場 奈良県文化会館(奈良市登大路町6)

主 催: 生体触媒化学会

共催、協賛: 日本化学会近畿支部、有機合成化学協会関西支部、  
日本農芸化学会、日本薬学会、日本生化学会、日本生物工学会

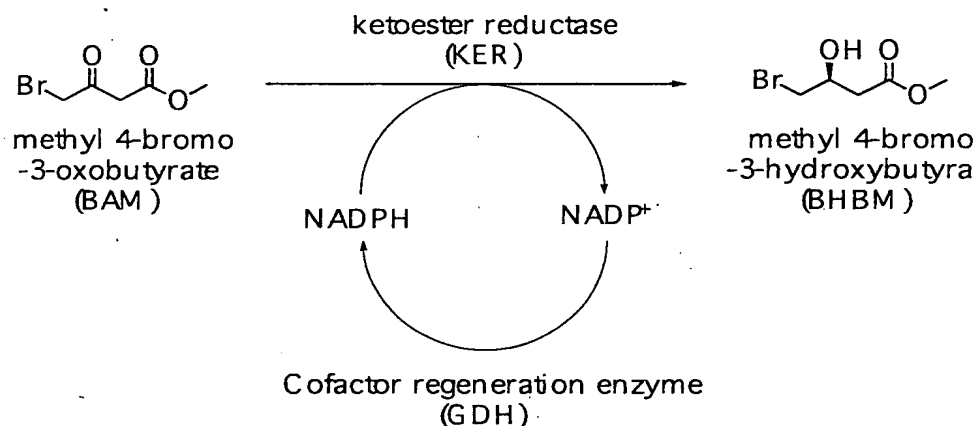
世話人: 中村 薫、山中 理央(京都大学化学研究所)  
松田 知子(龍谷大学理工学部物質化学科)

*Penicillium citrinum* 由来の  $\beta$ -ケトエステル還元酵素と補酵素再生系  
酵素の共発現系による光学活性アルコールの生産

(富山県大・工・生物工学研究センター、\*住友化学工業・有機合成研) 伊藤 伸  
哉、○坂野 公紀、朝子 弘之\*、脇田 龍平\*、清水 将年\*

Chiral alcohol production by  $\beta$ -ketoester reductase from *Penicillium citrinum* coupled  
with regeneration system of NADPH (Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.,  
\*Organic Synthesis Res. Lab., Sumitomo Chem. Co.) Nobuya Itoh, Kiminori Banno,  
\*Hiroyuki Asako, \*Ryuhei Wakita, \*Masatoshi Shimizu

*P. citrinum* 由来の  $\beta$ -ケトエステル還元酵素は NADPH に依存する活性を示す。  
本酵素遺伝子(*ker*)をクローニングし、その諸性質を明らかにした。また、本酵  
素を用いた光学活性アルコールの効率的な生産系を確立するために、グルコー  
ス脱水素酵素による補酵素再生系を共発現させた大腸菌を用い methyl 4-bromo-  
3-oxobutanoate(BAM)の不斉還元反応を検討した。



本酵素を用いて補酵素再生用酵素との共発現による光学活性アルコールの生  
産を行うために、*ker* 遺伝子の上流または下流に *Bacillus subtilis* から得られたグ  
ルコース脱水素酵素遺伝子 *gdh* をプラスミド pTrcRPc 上にタンデムに連結し、  
両酵素を共発現させた。この *E. coli* 菌体を用いて BAM の還元反応を行った。  
特に、プラスミド上での *ker*、*gdh* の位置を入れ替えることで発現酵素の活性を  
比較した。さらに高濃度の基質で反応を行うために、培地組成、温度、グルコ  
ース添加量、反応液の組成、pH、水-有機溶媒 2 相系の組み合わせを検討した。  
また野生型酵素の安定性と光学純度を向上させるために、酵素のタンパク質工  
学的改変を行い、安定性、光学純度ともに向上した変異酵素を得た。現在、同  
変異酵素を用いる反応を検討している。